

Luonnonvara- ja
biotalouden
tutkimus 23/2015

OPU-IVP -keinollisen lisääntymistekniikan soveltaminen tilaoloihin Pohjois-Savon lypsykarjatiloiilla

Heli Lindeberg

OPU-IVP -keinollisen lisääntymis- tekniikan soveltaminen tilaoloihin Pohjois-Savon lypsykarjatiloiilla

Heli Lindeberg



ISBN: 978-952-326-074-0 (Painettu)

ISBN: 978-952-326-024-5 (Verkkajulkaisu)

ISSN 2342-7647 (Painettu)

ISSN 2342-7639 (Verkkajulkaisu)

URN: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-024-5>

Copyright: Luonnonvarakeskus (Luke)

Kirjoittaja: Heli Lindeberg

Julkaisija ja kustantaja: Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki 2015

Julkaisuvuosi: 2015

Kannen kuva: Heli Lindeberg

Tiivistelmä

Heli Lindberg

Luonnonvarakeskus, Vihreä teknologia, Halolantie 31 A, 71750 Maaninka

Tässä hankeselvityksessä perehdytään keinolliseen lisääntymistekniikkaan, jolla elävästä naudasta kerätään munasoluja, joista tuotetaan koeputkialkioita eli OPU-IVP -tekniikkaan. Tämä tekniikka on vähitellen noussut toisen koeputkialkiotuantotekniikan, jossa alkiot tuotetaan teurastamunasarjoista kerätyistä munasoluista, rinnalle. Euroopan Alkionsiirtoyhdistyksen (AETEn) vuosittaisista raporteista selviää, että vuonna 2012 Euroopassa kerättiin noin 40 000 naudan OPU -munasolua, joista tuotettiin yli 8000 siirtokelpoista blastokystivaiheista alkioita alkionsiirtoon. Samana vuonna noin 14 400 teurastamomunasarjasta kerätyistä munasoluista tuotettiin 1 100 siirtokelpoista alkioita (AETE 2013). Vastaavasti vuonna 2003 OPU-IVP:llä tuotettiin 3 700 siirtokelpoista alkioita, ja teurastamomunasarjoista kerätyistä munasoluista 8 500 siirtokelpoista alkioita (AETE 2003). Euroopassa kaupallisen naudan koeputkialkiotutannon painopiste on selkeästi siirtymässä OPU-IVP -alkioihin, ja Suomi seuraa mukana tässä kehityksessä. Yhteispohjoismaisen jalostusorganisaatio Viking Geneticsin Hollolan asemalla ollaan aloittamassa kevään 2015 aikana OPU-IVP -ohjelma eli jalostusarvoltaan arvokkaista hiehoista kerätään munasoluja, joista tuotetaan koeputkialkioita Luonnonvarakeskus Jokioisten alkiolaboratoriossa.

Suomessa on kerätty munasoluja elävistä naudoista Luonnonvarakeskuksessa Jokioisilla ASMO-jalostusohjelmassa vuosina 1999–2000 ja erilaisissa tutkimushankkeissa vuosina 2002, 2005 ja 2012–2014, joissa munasolusaanto on ollut keskimäärin 5–6 munasolua OPUtuskertaa kohden. Näistä OPU-munasoluista tuotetuista koeputkialkioista on syntynyt eläviä jälkeläisiä. Tilatasolla OPUttamista ei ole Suomessa testattu. Uutena asiana tilatasolle siirtymisessä tulee myös kerättyjen munasolujen kuljettaminen pitkän välimatkan päähän alkiolaboratorioon. Tätä ei myöskään ole Suomessa aiemmin testattu, koska aiemmissa projekteissa Jokioisilla munasolut on kerätty navetassa, jonka läheisyydessä alkiolaboratorio sijaitsee.

OPUn hyödyt perinteiseen alkiohuuhteluun tai alkioiden tuottamiseen teurastamomateriaalista verrattuna ovat selkeät. Eläimiä voidaan OPUttaa yhtäjaksoisesti kaksi kertaa viikossa useiden kuu-kausien ajan ilman vaikutusta eläinten hyvinvointiin, joten kuukaudessa tuotettujen OPU -koeputkialkioiden lukumäärä nousee usein suuremmaksi kuin perinteisellä alkiohuuhtelulla, joka voidaan tehdä vain kerran kuukaudessa. Jo hyvin nuoriltakin eläimiltä voidaan kerätä munasoluja ja näin lyhentää sukupolvien välistä aikaa. OPU-IVP -alkioiden perimä tiedetään toisin kuin teurastamomunasoluista tuotettujen alkioiden. Munasoluja voidaan kerätä ja alkioita tuottaa sellaisistakin eläimistä, jotka eivät huonon hormonikäsittelyvasteensa vuoksi sovellu normaaliin alkiohuuhteluun. Myös tiineyden ensimmäisellä kolmanneksella eläimiltä voidaan kerätä munasoluja.

Pohjois-Savon alue on ihanteellinen tilatason OPU-IVP -hankkeen toteuttamiselle. Alueella on vankkaa kokemusta tilatason alkiohankkeista 2000-luvulla toteutettujen HAKA- ja AATE -hankkeiden muodossa. HAKA -hankkeen aikana luodut alkionsiirtorenkkaat ovat vakiinnuttaneet toimintansa (HAKA -brändi) ja viljelijät ovat innokkaasti ja enakkoluulottomasti osallistuneet hankkeisiin, joissa on mahdollisuus parantaa oman karjan jalostusta.

Tämä hankeselvitys kirjoitettiin osana Maatalousteknologisen tutkimuksen strateginen kehittäminen Pohjois-Savossa (MATSKU) -hanketta (ESR, Pohjois-Savon ely). Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT) yhdistyy 1.1.2015 Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) ja Metsän-tutkimuslaitoksen (Metla) kanssa Luonnonvarakeskukseksi (Luke). Hankeselvityksessä MTT:stä on käytetty yhdistymisen jälkeistä lyhennystä Luke.

Asiasanat: OPU-IVP, munasolu, keinohedelmöitys, koeputkialkiotutanto, blastokysti

Sisällys

1. Keinolliset lisääntymistekniikat tehostavat nautakarjan jalostusta	5
1.1. Ovum pick up eli opu	5
1.2. Opuun hyödyt	6
1.3. Oputuloksiin vaikuttavat tekijät.....	6
1.4. Oputustekniikka ja sen kehitystyö	9
1.5. Oputusohjelman aloittamisen edellytykset	9
1.6. Eläimen valmistelu oputusta varten	10
1.7. Oputtaminen.....	10
1.8. Kumulussolu-munasolukompleksien etsintä ja koeputkialkiotuoanto	11
2. Suunnitelma OPU-IVP -hankkeen toteuttamiseksi tilatasolla Pohjois-Savossa.....	15
2.1. Taustaa.....	15
2.2. Aiemmat pohjois-savon alkionsiirtojalostushankkeet	15
2.3. OPU-IVP -hankkeen toteuttamismahdollisuudet Pohjois-Savossa	16
2.4. OPU-IVP -hankkeen kuvaus.....	17
2.4.1. Hankkeen I-osio = OPU-IVP Maaningan tutkimusnavetassa (CowLab™)	17
2.4.2. Hankkeen II-osio = tilaOPU-IVP Pohjois-Savon lypsykarjatililla.....	18
3. Lähteet.....	19

1. Keinolliset lisääntymistekniikat tehostavat nautakarjan jalostusta

Lihaa tuottavat kotieläimet edistävät merkittävästi ihmisen hyvinvointia ja vaurautta. Luotettava ravinnonlähde on yksi tärkeimmistä ihmisten tarpeista. Tehokkaasti lihaa ja maitoa tuottava karja on siten yleisesti yhteiskunnan ja varsinkin eläintieteilijöiden sekä lihakarjan ja lypsykarjan kasvattajien suuri huolenaihe. Yleinen tavoite on jalostaa korkeatuottoisia eläimiä, jotka kykenevät tuottamaan suuria määriä maitoa usean lypsykauden ajan pysyen samalla terveisinä. Jotta tähän tavoitteeseen päästäisiin, on rakennettava tehokas kotieläinten jalostusohjelma. Viimeaikaiset läpimurrot bioteknologian saralla ovat tarjonneet karjankasvattajille heidän eläintensä tuottavuuden tehostamiseen tähtääviä apuvälineitä. Tällä hetkellä tarjolla olevien keinollisen lisääntymisen tekniikoiden listaan kuuluvat siemennesteen kerääminen, sukupuolilajittelu, pakastus ja keinosiemennäminen normaalilla tai sukupuolilajitellulla pakastesiemennesteellä sekä munasolujen kerääminen elävistä luovuttajista (ovum pick up, OPU), alkuiden tuottaminen elävässä eläimessä superovulaatiokäsittelyn avulla (multiple ovulation and embryo transfer, MOET), alkuiden tuottaminen koeputkessa (in vitro production of embryos, IVP), siittiön munasoluun ruiskutus (intracytoplasmic sperm injection, ICSI, hevosten koeputkialkiot tuotannon edellytys), alkuiden tuottaminen somaattisten solujen tumansiirrolla (somatic cell nuclear transfer), tuotettujen alkuiden pakastus, pakastettujen-sulatettujen huuhtelulla, koeputkessa tai tumansiirrolla tuotettujen alkuiden siirto. (Petyim 2002, Galli 2014).

Lisääntymistekniikat ovat aina olleet nautakarjanpidon keskiössä. Usein tekniikoiden kehittämisen vaikuttimena on ollut tutkijoiden uteliaisuus, mutta vasta maatilayrittäjän tarpeet ja kiinnostus vakiinnuttavat tekniikat. Näin on tapahtunut esimerkiksi, kun keinosiemennys kehittyi terveydenhoidollisesti estämään sairauksien leviämistä tai tänä päivänä genomiikan aikakaudella, kun alkioita voidaan genotyyppittää ja/tai tuottaa somaattisen solun tumansiirron avulla lisäämään valittujen vanhempien haluttua perimää (Galli ym. 2008). Nautakarjan tutkimus on vuosikymmenten ajan tuottanut keinollisista lisääntymistekniikoista tietoa, joka on siirtynyt ihmispuolen käyttöön. Koska nautakarjan sukusolujen ja varhaisvaiheisten alkuiden saatavuus on helppoa, naudankasvatuksen varhaiskehityksen vaiheet ovat samankaltaisia ihmisen alkion kanssa sekä koska karjapuolen eettiset vaatimukset ovat erilaisia, karjatutkijat ovat tutkimustiedollaan voineet edistää ja vakiinnuttaa ihmispuolta (Betteridge ja Rieger 1993). Vastavuoroisesti monet edistyneemmät ihmisille kehitetyt tekniikat ovat toimineet eläintutkijoille malleina kuten ensimmäinen ihmisen koeputkihedelmoitus (Stephoe ja Edwards 1978) ja myöhemmät kehitystulokset kuten naisen emättimen seinämän läpi tehtävä munasolujen kerääminen (Gleicher ym. 1983, Dellenbach ym. 1984, 1985).

1.1. Ovum pick up eli opu

Ultraääniohjattu emättimen seinämän läpi tapahtuva munasolujen imeminen munasarjan follikkeleista eli ovum pick up (OPU) kehitettiin edellä kerrotun mukaisesti ensin ihmisten hedelmättömyyden hoitomenetelmäksi, mutta pian sitä sovellettiin myös naudalle (Callesen ym. 1987, Pieterse ym. 1988, Schellander ym. 1989, Reichenbach ym. 1994). Munasolujen keräämistä eläviltä nautaluovuttajilta kokeiltiin myös muilla menetelmillä kuten puhkaisemalla follikkelit tähyttämällä vatsaontelon (laparoskooppisesti) kautta tai ultraääniohjatusi vatsanpeitteiden läpi, mutta kaikista tekniikoista ultraääniohjattu emättimen seinämän läpi tehtävä follikkeleiden puhkaisu eli OPU on vakiintunut tärkeäksi osaksi naudankasvatuksen alkuiden koeputkituotantoa ja alkionsiirtotoimintaa (Galli ym. 2001, Petyim 2002).

OPU -menetelmällä kerätyistä munasoluista tuotetaan koeputkialkioita (in vitro production of embryos, IVP) ensin kypsyttämällä munasolut (in vitro maturation, IVM), sitten hedelmöittämällä munasolut (in vitro fertilization, IVF) joko tavallisella pakastesiemennesteellä tai sukupuolilajitellulla pakastesiemennesteellä halutun sukupuolen tuottamiseksi ja lopuksi kasvatetaan (in vitro culture,

IVC) blastokystivaiheen alkioiksi, jotka joko siirretään vastaanottajiin tai pakastetaan nestetyyppeen odottamaan myöhempää alkionsiirtoa. Naudan koeputkialkiotuotanto vakiintui 1980 -luvulla, jolloin menetelmiä hiottiin tuottamalla alkioita teurastamomunasarjoista kerätyistä munasoluista (Galli ym. 2014). Toistettavat naudan (Tervit ym. 1972) ja lampaan (Galdolfi ja Moor 1987) normaalin jälkeläisen tuottavat alkioiden koeputkikypsytytys- (Staigmiller ja Moor 1984), koeputkihedelmoitys- (Brackett ym. 1982, Parrish ym. 1986) ja koeputkikasvatusmenetelmät (Lu ym. 1987) puolestaan mahdollistivat naudan OPU:n kehittymisen. Käytännön OPU-IVP -sovellutusta ajatellen on kuitenkin selkeästi houkuttelevampaa kerätä munasolut tiedetyn perimän omaavasta elävästä luovuttajasta kuin tuntemattomasta teurastamoluovuttajasta. Siten OPU-IVP -menetelmä on uusi tapa tuottaa koeputkialkioita ja se tarjoaa useita etuja optimoida luovuttajien lisääntymiskykyä verrattuna perinteiseen superovulaatiohormonikäsittelyyn ja eläimessä tuotettujen alkioiden huuhteluun (MOET, multiple ovulation and embryo transfer). (Cebrián Serrano 2013).

1.2. Opu:n hyödyt

OPU -menetelmä mahdollistaa munasolujen keräämisen ansiokkaista naaraista yhä uudelleen (Pietterse ym. 1988, Bols ym. 1995). OPU -tekniikalla voidaan hyödyntää suurta määrää munasarjassa kasvavia munasoluja (Cebrián Serrano 2013). Galli ym. (2001) mukaan OPU-IVP tuottaa enemmän alkioita kuukaudessa kuin MOET ja menetelmä sopii melkein kaikille naaraille riippumatta naaraiden elintoimintojen tilasta. Jokaisen OPU-tuskerran munasolut voidaan koeputkihedelmoittaa eri sonnin siemennesteellä, mikä lisää parituskumppaneiden lukumäärää ja tuottaa useampia perimäyhdistelmiä. Munasoluja voidaan kerätä kaksi kuukautta ja sitä vanhemmilta vasikoilta aikuisiin lemmiin, mikä antaa mahdollisuuden lyhentää sukupolven välistä aikaa, jos alkiot tuotetaan hyvin nuoresta tai ei sukukypsästä hiehosta (Galli ym. 2014). OPU -menetelmää voi edellä mainitun mukaisesti käyttää eläimille, jotka eivät vielä ole saavuttaneet sukukypsyyttä (Brogliatti ja Adams 1996), joilla ei ole säännöllistä kiimakiertoa (Looney ym. 1994) sekä eläimille, jotka ovat kantavia (Kruip ym. 1994). Myös hevosia (Brück ja Greve 1994, Galli ym. 2007), vuohia (Graff ym. 1995), laamoja (Brogliatti ym. 1996) ja puhveleita (Boni ym. 1996, Galli ym. 1998) voi OPU:ta. Kuten naudan myös puhvelin OPU-IVP -yhdistelmä on tuottanut enemmän siirtokelpoisia alkioita kuin MOET -ohjelma (2 versus 0,6 alkioita/kuukausi) (Gasparrini 2002).

OPU:n ja koeputkialkiotuotannon yhdistäminen tarjoaa menetelmän tuottaa alkioita ilman luovuttajan hormonikäsittelyä (Cunningham 1998). OPU -menetelmällä ei ole haitallisia vaikutuksia karjan hyvinvointiin eikä hedelmällisyyteen (Petyim 2002, Chastant-Maillard ym. 2003, Petyim ym. 2007). Itse asiassa OPU:n vaikutus on päinvastainen, koska sen avulla voidaan hoitaa tiettyjä hedelmällisyysongelmia (Bols ym. 1997, Hasler ym. 1995). On ymmärrettävää, että OPU -menetelmän monipuolisuus yhdessä turvallisen ja toistettavan koeputkialkiotuotantomenetelmän kanssa on viime vuosina tehnyt OPU-IVP:stä naudan keinollisen lisääntymisen ja jalostusta parantavien hankkeiden rutiinimenetelmän (Galli ym. 2014).

1.3. Oputuloksiin vaikuttavat tekijät

Alun perin munasoluja kerättiin ongelmalehmiltä, jotka eivät vastanneet superovulaatiokäsittelyyn (Kruip ym. 1994, Looney ym. 1994), mutta myöhemmin OPUa sovellettiin laajemmassa mittakaavassa ja myös tiineitä lemmiä ja ei-sukukypsiä hiehoja OPUtettiin (Galli ym. 2001). Eri tutkimusten OPU-tuloksia on vaikea verrata toisiinsa järkevällä tavalla, koska muuttujia on yleensä liikaa ja useimmat ovat jopa hallitsemattomia. Yleensä lihanautoista voidaan OPU:ta enemmän munasoluja kuin lypsy-lemmistä, ummassa olevista lehmistä saadaan enemmän munasoluja kuin lypsyssä olevista lehmistä ja lehmistä OPUtetaan enemmän munasoluja kuin hiehoista (taulukko 1.). Lämpötilaolosuhteet kuten korkea lämpötila ja lämpöstressi vähentävät follikkelien lukumäärää ja huonontavat munasolujen laatua.

Lisääntymis- ja eläintuotannontutkijoita on ajanut eteenpäin halu lisätä kerättyjen munasolujen lukumäärää ja parantaa munasolujen laatua (Merton ym. 2003, van Wagendonk-de Leeuw 2006). Siksi monet aiheesta julkaistut tieteelliset tutkimukset ovatkin keskittyneet parantamaan OPU -menetelmän tehokkuutta ja tekijöitä, jotka vaikuttavat kerättyjen munasolujen saantoon ja munasolujen myöhempään kehittymiskykyyn. Gallin ym. (2014) kokemuksen mukaan luovuttajaeläimen hoito ja perimä ovat suurin vaihtelun lähde OPUtustuloksissa. Biologisten tekijöiden vaikutusta OPU-IVP -menetelmään on tutkittu laajasti viime vuosina. Näistä ainakin luovuttajan kiimakierroksen vaihe (Petyim 2002), OPUtuskertojen välisen ajanjakson pituus (Merton ym. 2003, Chaubal ym. 2006), hormoneilla käsittely ennen OPUtusta (Lacaze ym. 1997, Sirard ym. 1999, De Roover ym. 2005) ja luovuttajan tuotantovaihe (Kendrick ym. 1999) vaikuttavat OPUlla kerättyjen munasolujen lukumäärään ja laatuun. OPUtushetkellä vallitseva follikkeliaallon vaihe ja puhkaistavien follikkelien (antraali-follikkelien) koko puolestaan vaikuttavat follikkeleista kerättyjen munasolujen luontaiseen kehittymiskykyyn (Lonergan ym. 1994, Hagemann ym. 1999). Kerätyt kumulussolu-munasolukompleksit pysyvät korkealaatuisina ja melko tasakoosteisena OPUtuskertojen toistuessa kolmen tai neljän päivän välein, koska jokainen OPUtuskerta käynnistää uuden follikkeliaallon munasarjoissa (Merton ym. 2003), mikä edesauttaa munasolujen kelpoisuutta (Merton ym. 2003).

Nykykäsityksen mukaan luovuttajaeläinten ruokinnalla (Leroy ym. 2008a, 2008b, 2011) kuten myös eläimen perimällä (Merton ym. 2009) on tärkeä merkitys munasolun ja alkion laadulle. Perimän tärkeys on selvinnyt anti-Müllerian hormonin plasmapitoisuustutkimuksissa (Monniaux ym. 2010), joiden perusteella hormonilla voidaan käytännössä mitata jokaisen yksittäisen luovuttajan munasarjoissa näytteenottohetkellä oleva follikkelijoukko (Rico ym. 2012) ja näin maksimoida alkiotuotanto. Luovuttajien etukäteen valinta ei kuitenkaan aina ole mahdollista varsinkin, kun tarkoin määrätyt perinnöllisyysohjelmat vaativat valitut yksilöt luovuttajiksi. Tämän vuoksi on tehty paljon tutkimustyötä alkiosaannon parantamiseksi. Munasolujen kerääminen kahdesti viikossa on monien tutkijoiden mielestä tehokkain menetelmä maksimoida munasolusaanto ilman hormonikäsittelyä (Galli ym. 2001, Hasler ym. 1995, Merton ym. 2003 taulukko 2.) ja ilman sivuvaikutuksia eläimen hyvinvointiin (Chastant-Maillard ym. 2003, Petyim ym. 2007) sekä välttää munasarjoissa dominoivan follikkelin läsnäolo, mikä saattaa vaikuttaa kielteisesti munasolujen kehityskykyyn (Machatkova ym. 2004). Alkiosaannon kasvattamiseksi ja kaksi kertaa viikossa OPUttamisen työmäärän vähentämiseksi on luovuttajaeläimille käytetty gonadotropiiniärsytystä. Tämä tekniikka ei kuitenkaan ole paras ratkaisu ongelmaluovuttajille, jotka yleensä siirtyvät OPUtettaviksi, koska ovat jo epäonnistuneet tuottamaan alkioita superovulaatiokäsittelyn jälkeen. Gallin ym. (2014) mukaan valinta hormonikäsittelyn ja OPUttamisen yhdistämisestä pitäisi tehdä sekä saatavilla olevan luovuttajan tyyppin että aiempien hormonikäsittelyjen onnistumisen mukaan. Gonadotropiiniärsytyksen käyttäminen OPUtuksissa (Looney ym. 1994, Bousquet ym. 1999, Chaubal ym. 2007, De Roover ym. 2008) on vaihdellut täydestä superovulaatiokäsittelystä lyhyempiin 2–3 päivää kestäviin yksi tai kaksi pistosta päivässä käsittelyihin progesteronia vapauttavan emätinkierukan tai keltarauhasen läsnä ollessa. Sirard ym. (1999) raportoivat follikkeliaallon yhdenaikaistamisen ja 3 päivän mittaisen kuuden vakiopitoisuuden sisältävän gonadotropiinipistos-käsittelyn jälkeen 48 tunnin odotusajan ennen OPUtusta olevan optimaalinen myöhemmälle munasolujen kehittymiskyvylle. Ei sukukypsiä vasikoita OPUtettaessa gonadotropiiniärsytys on välttämätön munasolujen hyväksyttävän kehittymiskyvyn saavuttamiseksi (Galli ym. 2001).

Ennen OPUtusta annettavien erilaisten hormonikäsittelyiden ajatellaan käynnistävän luovuttajan munasarjasta puhkaistavien follikkelien ja kerättyjen munasolujen lukumäärän kasvattamiseen tähtäävän ärsytysvasteen. Tähän käytettyjä hormoneja ovat GnRH (gonadotropiineja vapauttava hormoni, Bordignon ym. 1997), eCG (tamman istukkahormoni, equine chorionic gonadotrophin, Vos ym. 1994, van de Leemput ym. 1999), FSH (follikkelia stimuloiva hormoni, Bousquet ym. 1999, Sirard ym. 1999, van de Leemput ym. 1999), gonadotropiini plus BST (bovine somatotropiini, naudan kasvuhormoni, Hwang ym. 1997) sekä anti-inhibiini immunisaatio (Konishi ym. 1996). Hormonit aikaansaavat munasolujen kypsymisen eläimessä itsessään (in vivo kypsytyks), jolloin pienten follikkelien koko kas-

vaa (ja OPUtuksessa voidaan imeä useampi follikkeli) ja munasolut saavuttavat paremman kehitysmiskyvyn (Merton ym. 2003).

Hormoniärsytysmenetelmiä on useita ja niihin esitetyistä parannuksista huolimatta, kuten ”odotusajan” lisääminen FSH -käsittelyn ja OPUtuksen välille (Sirard ym. 1999), käsittelyjen tulokset eivät todellisuudessa aina ole merkinneet sellaisia parannuksia, jotka olisivat myöhemmin hyvittäneet käsittelyn aiheuttaman kustannusten nousun (Merton ym. 2003, De Roover ym. 2005). Siksi hormonikäsittelyjä ennen OPUtusta on pidetty hieman epävarmana vaihtoehtona parantaa OPU-IVP:n tehokkuutta, koska ne tuovat takaisin ongelman, jonka OPU -menetelmän alun perin piti ratkaista eli superovulaatiovasteen suuren yksilöllisen vaihtelun gonadotropiinkäsittelylle (Mapletoft ym. 2002). Silti tämän hetkinen käsitys varsinkin lihalehmien pitkäaikaistutkimusten perusteella on, että FSH:n käyttö ennen OPUa tuottaa enemmän alkioita kuin käyttämättä jättäminen (De Roover ym. 2008).

Taulukko 1. Holstein lehmistä ja hiehoista OPUtuksella kerätyistä munasoluista tuotetut alkio (Galli ym. 2014).

Luovut-taja	OPUtuksen lukumäärä	Follikkeli-lukumäärä	Muna-solu-lukumäärä	Muna-solu-lukumäärä/ OPU	Jakautu-neiden alkioiden lukumäärä	Jakau-tumis %	Alkioiden lukumäärä	Alkioiden lukumäärä/ OPU	% alkioi-ta/ muna-solu-luku-määrä	% alkioita/ jakautuneiden alkioiden lukumäärä
Lehmä	2251	41983	28852	12,81	19711	68,32	5601	2,49	19,41	28,42
Tiine hieho	97	1103	705	7,26	494	70,07	139	1,43	19,72	28,14
Suku-kypsä hieho	566	9048	5900	10,42	4052	68,68	1054	1,86	17,86	26,01
Ei suku-kypsä hieho	258	4110	2800	10,85	1885	67,32	447	1,73	15,96	23,71

Taulukko 2. Lypsykarjan nykyisten alkio-tekniologioiden alkiontuotantotehokkuus (muutettu Merton ym. 2003).

Käsittely ennen alkiohuuhtelua/munasolujen keräystä	Alkioiden lukumäärä	
	huuhtelu-/ OPUkerralla	Viikossa
Luonnollinen kiimakierto, keinosiemennys ja päivänä 7 alkionhuuhtelu	0,7	0,23
MOET, perinteinen superovulaatiokäsittely	6	1
DFR-MOET, dominoiva follikkeli poistettu ennen superovulaatiokäsittelyä	5,5	1,1
OPU kahdesti viikossa 3 tai 4 päivän välein	1	2
OPU kahden viikon välein FSH ärsytyksellä	3	1,5
(DFR) MOET-OPU, superovulaatiokäsittely ja munasolujen keräys ennen ovulaatiota	5,5	1,1

MOET = multiple ovulation embryo transfer, DFR = dominant follicle removal, OPU = ovum pick up

1.4. Oputustekniikka ja sen kehitystyö

Ensimmäinen naudan OPU-menetelmän kuvaus julkaistiin yli 25 vuotta sitten (Callesen ym. 1987, Pieterse ym. 1988). OPU:n perusteet ovat pysyneet suurelta osin samanlaisina kuin miten Pieterse ym. (1988) ne kuvasi ja ovat monilla praktikoilla käytössä sellaisenaan. Pieterse ym. (1988) raportoiivat munasolusaantoprosentiksi 55, menetelmän toistettavaksi sekä luovuttajaeläimille sivuvaikutuksista vapaaksi. Munasolusaanto on parantunut yli 70 %:iin parempien ultraäänilaitteiden avulla, jotka on varustettu 6 tai 7 MHz:n kuperalla rivi-anturilla, jonka pienten follikkelien erotuskyky on parempi sekä gonadotropiinipohjustuksen käytön avulla, joka kasvattaa pienten follikkelien kokoa, jotka jäisivät muuten kokemattomalta OPUlaitteen käyttäjältä puhkaisematta ja imemättä.

Bols ym. (1995) yksinkertaistivat Pieterse ym. (1988) menetelmää alkamalla käyttää yksittäisiä ihonalaiskäyttöön tarkoitettuja kertakäyttöisiä neuloja. Tämä yksinkertaistettu OPUuslaitteisto on kooltaan suurempi ja soveltuu hyvin lehmille, mutta saattaa kokonsa vuoksi olla vahingollinen hyvin nuorille hiehoille. Alkuperäistä emättimensisäistä anturia käytettäessä jokaisen OPUtettavan eläimen kohdalla vaihdettiin neulanohjain, neula ja anturia peittävä lateksisuojaus. Siten kului enemmän tarvikkeita ja vaadittiin enemmän puhdistus-, sterilointi- ja pakkaustyötä, jonka seurauksena menetelmä oli kalliimpi. Toisaalta hygieenisyyden ja laaduntarkkailun kannalta tämän menetelmän käyttäminen estää luovuttajia saastuttamasta toisiaan ja siksi voidaan noudattaa samoja korkeita bioturvallisuuden normeja kuin ihmispuolella. Sitä vastoin yleistä anturia käytettäessä anturi työnnetään muoviseen tai metalliseen koteloon, jossa on oma kanava neulanohjaimelle, jonka kautta OPUtettavien eläinten välillä on helppoa ottaa neulanohjain ulos ja vaihtaa ohjaimeen uusi kertakäyttöinen ja halvempi neula, jolla follikkelineste imetään. Vaikka emättimen seinämää puhkaistaessa neulanohjaimeen imeytyy kapillaarisesti aina jonkin verran verta samoin kuin anturin ympärille, neulanohjainta ei kuitenkaan normaalisti vaihdeta eläinten välillä, koska se on suljettuna kotelon sisälle. Molemmissa kokoonpanoissa neula on yhdistettynä letkujen avulla vakuumpumppuun, joka kehittää tyhjiön virtausnopeudella 15–25 ml/min (Galli ym. 2001) varmistaen maksimaalisen munasolusaannon vahingoittaen kumulussolu-munasolukomplekseja mahdollisimman vähän.

Teknisistä tekijöistä, jotka vaikuttavat lopulliseen OPU-IVP menetelmän tehokkuuteen (ilmoitettuina tuotettuina alkioina/OPUtuskerta), tyhjiöpumpun luomalla paineella, follikkelinesteen imemiseen käytetyn neulan paksuudella (ohut neula parempi) ja neulan kärkeviirteen pituudella (pitkä viiste parempi) on ollut merkittävä vaikutus (Bols ym. 1997, Fry ym. 1997). Virtausnopeus on ohjeellisempi kuin tyhjiön paine, koska neulan paksuudella ja letkutuksen pituudella on suuri merkitys. Munasoluja kerätessä voidaan käyttää yksinkertaista alkiohuuhteluliusta hepariinilla lisättynä estämään follikkelinestettä tai verta hyytymästä letkuihin tai neulaan/neulanohjaimeen.

Yksi tärkeimmistä edistyksistä OPU:n kehityksessä on ollut edellä mainittu Bols ym. (1995) OPU-tusmalli, jossa on helpommin vaihdettavat, steriilit, kertakäyttöiset ja halvemmat neulat kuin 50 cm:n alkuperäiset ruostumattomasta teräksestä valmistetut neulat. Bols ym. (1995) kuvaamaa OPUusmallia käytetään tänä päivänä nautaeläinten OPUuksessa.

1.5. Oputusohjelman aloittamisen edellytykset

Nautakarjan keinollisen lisääntymisen tekniikoiden käytännön sovelluksen pitää yhdistää hallitusti koeputkialkiot tuotannon laboratoriomenetelmät ja luovuttajaeläinten, vastaanottajaeläinten ja syntyneiden jälkeläisten terveyden- ja sairaudenhoito, koska asiakkaalle, joka palvelua haluaa, vain elävä jälkeläinen on merkityksellinen. Siksi OPU -ohjelman käyttöönotto vaatii aina koeputkialkioiden tuotantoon erikoistuneen laboratorion mukanaolon. Nautakarjaa ajatellen edistysellisten keinollisten lisääntymismenetelmien kehittämisen haluun liittyy tarve tuottaa suuria lukumääriä karjan perimää parantavia tiettyä sukupuolta ja haluttua perimää olevia alkioita. Koska alkioista syntyvät vasikat ovat arvokkaita, riittävä eläinlääkäriapu on varmistettava mahdollisten menetysten välttämiseksi poikimisten yhteydessä tai muiden tavallisten synnytyksenaikaisten tautien varalta.

1.6. Eläimen valmistelu oputusta varten

Munasolujen keräämisen onnistumiseksi OPUtettavalle eläimelle on järjestettävä paikka, jossa eläin voidaan turvallisesti käsitellä. Mikäli käytössä ei ole pakkopilttuuta, navetassa tulee olla esimerkiksi erillinen parrenerottajilla erotettava alue, johon eläin voidaan kuvan 1. mukaisesti sitoa paikoilleen vetämällä naru tai vaijeri pääpuolesta takapään ympäri niin, että liikkuminen eteen, taakse ja sivusuunnassa estetään. OPU:n onnistumiseksi eläimen on seisottava paikoillaan ja peräsuolen on oltava rentoutunut. Paikallaan pysyminen on tärkeää siksi, että eläimen sisällä liikkuu neula, jolla ei haluta pistää muualle kuin emättimen seinämän läpi ja munasarjaan. Rentoutuminen aikaansaadaan antamalla selkäydinpuudutus 7–9 ml lidokaiinihydrokloridia (Chaubal ym. 2006) ja joissakin tapauksissa joudutaan käyttämään myös kaulalaskimoon tai epiduraalitilaan annettavaa rauhoitusainetta. Selkäydinpuudutusta varten eläimen hännän päältä ajetaan karvat ja alue puhdistetaan alkoholilla. Häntää liikuttalemalla selvitetään nikamavälin kohta, johon puudutusaine ruiskutetaan 20 G:n keltaisella neulalla, jonka käytöstä ei ole todettu haittavaikutuksia (Petyim ym. 2007). Odotetaan puudutuksen vaikutusta, jolloin eläimen häntä veltostuu. Tämän jälkeen poistetaan uloste peräsuolesta ja sidotaan eläimen häntä kiinni eläimen sivulle. Peräpää puhdistetaan alkoholilla.



Kuva 1. OPUtettavan eläimen rajoittaminen OPUtusta varten (kuva Petyim ym. 2007).

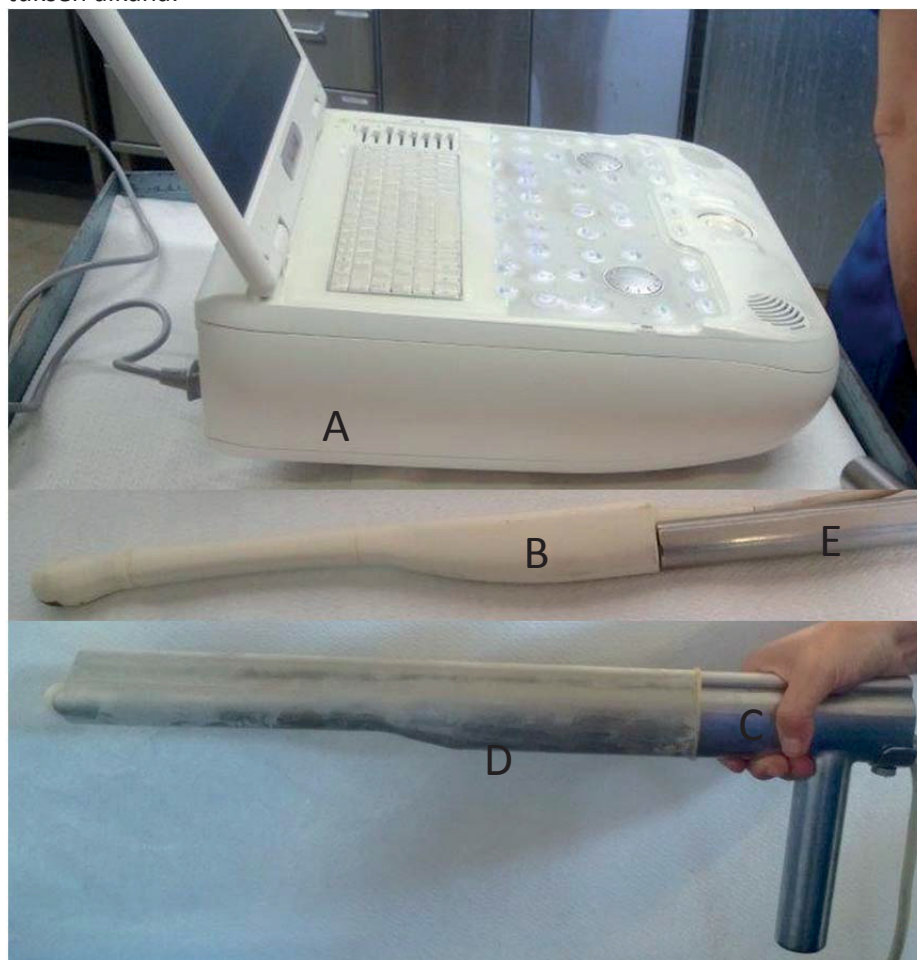
1.7. Oputtaminen

Munasolut kerätään ultraääniohjatusti imemällä neulalla follikkelineste munasarjan follikkeleista. Imun mukana saadaan munasolu irtomaan follikkelinesteeseen. Keräyslaitteistoon kuuluva kondomilla (kuva 2. D.) suojattu ultraäänianturin sisältävä anturipidike (kuva 2. C.) asetetaan seisovan eläimen emättimen pohjaan. Ultraäänilaitteen kuvaruudusta (kuva 2. A.) katsomalla asetetaan munasarja ja peräsuolella olevan käden avulla lähelle anturipidikkeeseen metallisella lisäosalla (kuva 2. E.) lukittua ultraäänianturin (kuva 2. B.) kärkeä (kuva 3. B.) ja follikkelinesteen imemiseksi työnnetään neulanohjaimen (kuvassa 4. A. - F. keräysvalmiina letkuineen) kiinnitetty kertakäyttöneula anturipidikeen neulanohjaimen kanavan (kuva 3. C.) kautta emättimen seinämän läpi munasarjassa olevaan

follikkeliin. Tyhjiöpumpun (kuva 3. A.) paineella imua pidetään päällä koko OPUtuksen ajan. Munasolut imetään lämmitettyyn keräysliuokseen ja kaikki samassa tasossa olevat follikkelit imetään yhdellä kerralla yksi toisensa jälkeen ottamatta neulaa ulos munasarjasta. Keltarauhasen puhkaisua vältetään mikäli mahdollista. Kun ultraäänilaitteen kuvaruudusta katsottuna munasarjassa on jäljellä vain epäsäännöllisen näköisiä mustia alueita, kaikki follikkelit on todennäköisesti imetty. Mustat alueet ovat verta eivätkä follikkeleita. Tämän jälkeen vaihdetaan munasarjaa. Mikäli imuletku (kuva 3. D.) on auki ja follikkelineste kulkee hyvin, ei tarvitse tulla ulos eläimestä vaan voidaan suoraan siirtyä toiseen munasarjaan. OPUtuksen päättämisen jälkeen munasolukeräysputkesta poistetaan tulppa (kuva 3. F.) ja putki suljetaan kierrekorkilla ja kuljetetaan alkiolaboratorioon tai tilaan, jossa kumulussolu-munasolukompleksit etsitään.

1.8. Kumulussolu-munasolukompleksien etsintä ja koeputkialkio-tuotanto

Mikäli follikkelineste imetään alkiolaboratorion läheisyydessä olevassa eläintilassa, voidaan suljettu keräysputki kuljettaa laboratorioon sellaisenaan. Mikäli kuljetusmatka on pitkä, munasolut lähetetään alkiolaboratorioon esim. suljetussa muoviputkessa lämpimässä kypsyysliuoksessa, jonka pH ja lämpötila on säädetty hiilidioksidilla tai Hepeksellä (Galli ym. 2001). Kuljetuksessa voidaan käyttää virtalähteeseen kytkettävää tai patterikäyttöistä lämpötilasäädettävää kuljetusinkubaattoria. Euroopan nauta-alkiolaboratoriot lähettävät kauempana sijaitsevasta OPUtuspaiikasta OPUtettavien nautojen munasolut alkiolaboratorioon inkubaattoreissa, joissa munasolujen kypsyminen voi alkaa jo kuljetuksen aikana.

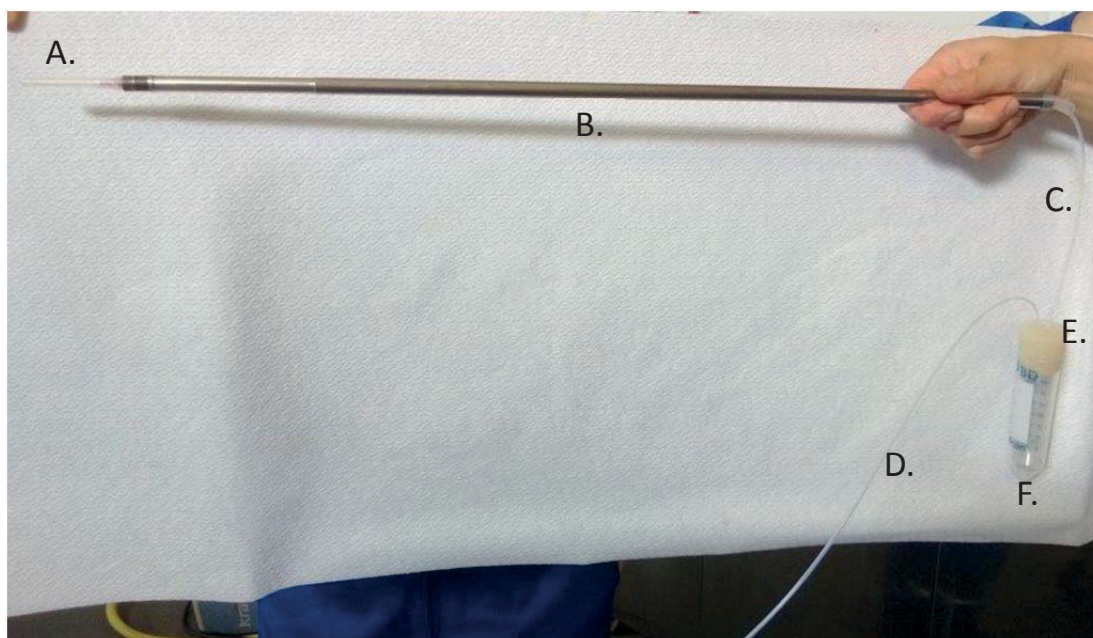


Kuva 2. A. Ultraäänilaitte. B. Ultraäänianturi. C. Anturipidike D. Suojus (kondomi) E. Ultraäänianturin lukitsemiseen anturipidikkeen sisälle tarkoitettu metallinen lisäosa. Kuvat Marja Mikkola.



Kuva 3. A. Tyhjiöpumppu. B. Ultraäänianturin kärki. C. Anturipidikkeen neulanohjaimen kanava. D. Imuletku. E. Tyhjiöpumpun letku. F. Munasolukeräysputken tulppa. Kuvat Marja Mikkola.

OPU-munasolukeräysputken sisältö on poikkeuksetta aina veristä. Verinen putken sisältö suodattetaan tarkoituksena poistaa verihyytymät ja veri follikkelinesteestä. Veri haittaa sekä kumulussolu-munasolukompleksien etsintää että munasolujen kehittymistä.



Kuva 4. Neulanohjain ja letkut keräysvalmiina. A. Kertakäyttöneula. B. Metallinen neulanohjain. C. Imuletku. D. Tyhjiöpumpun letku. E. Tulppa. F. Munasolukeräysputki. Kuva Marja Mikkola.

OPU-koeputkialkiot tuotetaan samoin kuin teurastamomunasarjoista tuotetut koeputkialkiot. Stereomikroskoopin avulla Petri-maljalta löydetty kumulussolu-munasolukompleksit (kuva 5.) siirretään kypsymään hiilidioksidi-inkubaattoriin (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂, suhteellinen kosteus 100 % ja +39 °C) 22–24 tunnin ajaksi. Kypsytytetyt kompleksit (kuva 7.) pestään ja siirretään hedelmöitykseen pestyn ja tiheysmääritetyn siemennesteen kanssa (kuva 6.). Kompleksit hedelmöitetään hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂, suhteellinen kosteus 100 % ja +39 °C) 18–20 tunnin ajan. Hedelmöitetystä munasoluista poistetaan ympärillä olevat kumulussolut, jonka jälkeen munasolut pestään ja siirretään kasvatusliuokseen 1 seoskaasuinkubaattoriin (5 % CO₂, 5 % O₂, 75 % N₂, suhteellinen kosteus 100 % ja +39 °C) 3 vuorokaudeksi.



Kuva 5. Teurastamomunasarjoista kerättyjen kumulussolu-munasolukompleksien etsiminen. Kuva Kirsi Kananen.

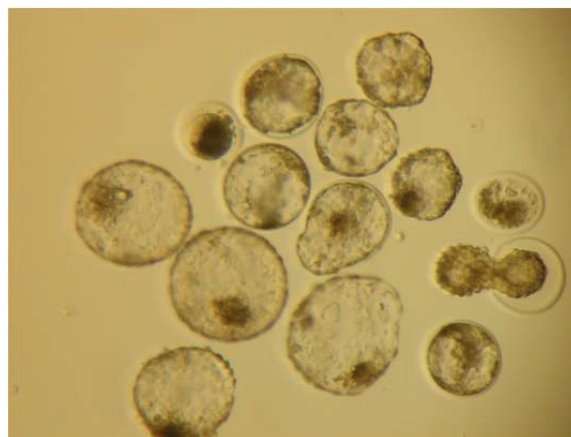


Kuva 6. Teurastamomunasarjoista kerättyjen kypsytettyjen kumulussolumunasolukompleksien siirtäminen pesun kautta hedelmöitysluokseen (IVF-liuos) nelikuoppamaljalle. Kuva Kirsi Kananen.

Toisena kasvatuspäivänä yksisoluiset poistetaan ja jakautumaan lähteneet jätetään kasvamaan. Kasvatusliuos vaihdetaan kasvatusliuokseksi 2 ja sitä tuoreennetaan keskimäärin joka toinen päivä. Alkioita kasvatetaan kasvatusliuoksessa 2 päivään 7, jonka jälkeen blastokysteiksi kehittyneet alkiot (kuva 8.) joko siirretään tuoreina vastaanottajiin tai pakastetaan nestetyyppeen odottamaan myöhemmin tapahtuvaa alkionsiirtoa.

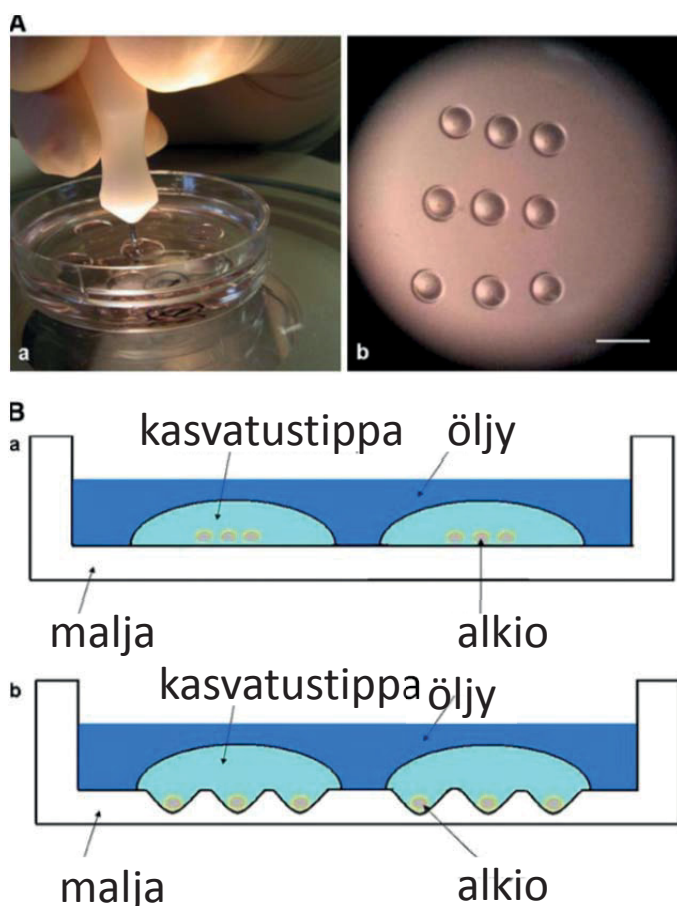


Kuva 7. Naudan teurastamomunasarjoista kerättyjä munasoluja koeputkikypsytyksen jälkeen. Kuva Kirsi Kananen.



Kuva 8. Naudan teurastamomunasarjoista kerätyistä munasoluista koeputkessa tuotettu- ja 7-päivän ikäisiä blastokystivaiheen alkioita, joista osa kuoriutumassa zona pellucidan eli munasolun keton sisältä ja osa jo kuoriutunut. Kuva Kirsi Kananen.

Gallin ym. (2001) mukaan OPUtettaessa saadaan keskimäärin 7–12 kumulussolununasolukompleksia, joista saadaan tuotettua noin kaksi siirtokelpoista alkioa. Koeputkialkiotuoannossa teurastamomateriaalia käytettäessä kypsytytipassa on noin 50 kumulussolununasolukompleksia. Pienen lukumääränsä vuoksi OPUtuksella kerätyt kumulussolununasolukompleksit kypsytetään tilavuudeltaan pienemmissä pisaroissa. Hedelmöittymistä voidaan yrittää tehostaa vaihtamalla perinteinen FERT-TALP -hedelmöitysluos synteettiseksi munanjohdinsiivoksi (synthetic oviductal fluid, SOF), vähentämällä happipitoisuutta 20 %:sta 5 %:iin ja käsittelemällä siemenneste Percoll gradientilla, jonka ansiosta hedelmöitykseen saadaan suurempi lukumäärä liikkuvia siittiötä kuin perinteisellä sentrifugoinnilla (Galli ym. 2001). OPUalkioita kasvatettaessa kasvatustipan tilavuutta voidaan pienentää käyttämällä mikrotippoja (20 µl) tai WOW (well-of-the-well) -tekniikkaa, jossa kasvatusmaljan pohjaan on tehty kuoppia, joihin kuhunkin pipetoidaan yksi alkio (kuva 9.). WOW -tekniikkaa käyttäen voidaan parantaa blastokystiksi kehittyvien alkoiden lukumäärää perinteiseen kasvatukseen (joukko alkioita 50 µl:n kasvatustipassa) verrattuna (Dai ym. 2012).



Kuva 9. WOW (well-of-the-well) -menetelmä alkoiden kasvattamiseksi. A. WOW -menetelmän kuoppien tekeminen kasvatuslevylle. a. Kuopat tehdään painamalla manuaalisesti neulan kärjellä levyn pintaa paraffiiniöljyn alla. b. 9 kuoppaa 50 µl:n kasvatustipassa paraffiiniöljyn alla. B. Sivukuva-
piirros kahdesta alkionkasvatusmenetelmästä. a. Kaksi 50 µl:n kasvatustippaa paraffiiniöljyllä peitet-
tynä Petri-maljan tasaisella pohjalla. b. Kaksi WOW -menetelmän 50 µl:n kasvatustippaa Petri-maljan
pohjalla paraffiiniöljyllä peitettyä kukin alkio omassa kuopassaan (mukaeltu Dai ym. 2012).

2. Suunnitelma OPU-IVP -hankkeen toteuttamiseksi tilatasolla Pohjois-Savossa

2.1. Taustaa

Pohjois-Savon maaseutu on vahvaa perusmaatalousaluetta erityisesti maidontuotannossa. Kiintiökaudella 2013/2014 Pohjois-Savossa tuotettiin 1261 lypsykarjatilalla (13,7 % kaikista Suomen lypsykarjataloista) yhteensä 318 129 tuhatta litraa maitoa (14,1 % kaikesta Suomessa tuotetusta maidosta) (<http://www.maataloustilastot.fi/alueittainen-maidontuotanto>). Kiintiökaudella 2013/2014 Suomen viisi suurinta maidontuottajakuntaa olivat: Kokkola, Kiuruvesi, Nivala, Kuopio ja Vieremä. Kuopio nousi viiden suurimman joukkoon, kun Nilsia liittyi siihen vuoden 2013 alussa ja Maaningan liittyessä 2015 Kuopio nousee Suomen suurimmaksi maidontuottajakunnaksi. Vaikka maatilojen lukumäärä on laskenut viime vuosina, tuotannon volyymi ei ole juuri muuttunut tilakokojen suurentuessa ja tuotannon tehostuessa. Pitkällisen jalostustyön ja maitotilayritysten korkean ammattitaidon ansiosta pohjoissavolaisilla maitotiloilla on valtakunnan parasta eläinainesta, sillä suhteellisesti korkea osuus Suomen parhaista eläimistä ja sonninemistä on pohjoissavolaisia.

Eläinaineksen jalostus parantaa maidontuotannon kannattavuutta. Perinnöllisesti parhaiden eläinten valinta seuraavan sukupolven vanhemmiksi on taloudellisesti kestävä eläinvalinnan perusta. Perimän parantuessa ja maidontuotannon tehostuessa maidon tuotantokustannukset pienenevät merkittävästi. Tuotantokustannukset jakaantuvat useammalle maitokilolle ja maitokiintiö voidaan tuottaa täyteen pienemmällä lehmälukumäärällä. Eläinvalinnan myötä myös rakennevioidista, sekä hedelmällisyyden ja terveysongelmista aiheutuvat kustannukset pienenevät. Jalostussuunnittelulla pyritään maitotilayrityksen taloudellisen kannattavuuden paranemiseen. Maitotilayrityskohtainen jalostussuunnittelu on ensisijaisesti lehmävalintaa ja uuden sukupolven vanhempien etsintää. Perinteisesti lehmälle syntyy vain yksi vasikka vuodessa ja keskimäärin yksi tytär koko sen elinaikana. Tilatason jalostussuunnitelman tekee useimmiten FABA osk:n jalostusneuvoja. Karjaa kehitetään tuottavaksi, terveeksi ja kestäväksi, hedelmälliseksi ja helpohoitaiseksi. (ks. www.faba.fi).

2.2. Aiemmat Pohjois-Savon alkionsiirtojalostushankkeet

Pohjois-Savon maitotilayritykset ovat edelläkävijöitä alkionsiirtojalostuksessa. Pohjois-Savo on kautta kaupallisen alkionsiirron historian ollut edelläkävijä alkionsiirtotekniikoiden hyödyntämisessä lypsykarjan jalostuksessa. Alue on ollut vuodesta toiseen maakuntien ykkösen tilatason alkionhuuhteluiden ja -siirtojen lukumäärissä. Pohjoissavolaisissa maitotilayrityksissä alkionsiirto on vakiintunut eläinjalostuksen työkaluksi keinosiemennyksen ohelle ja tilat ovat hyödyntäneet alkioiden sukupuolilajittelua ja käyttäneet sukupuolilajiteltua pakastesiemennestettä huuhtelusiemennyksissä. Pohjois-Savon alkionsiirtoalan toimijat tekevät pitkäjänteistä työtä alkionsiirtopalvelujen kehittämiseksi.

Pohjois-Savon maitotilayritykset ovat olleet aktiivisesti mukana alkionsiirtotekniikoiden kehittämishankkeissa. Pohjois-Savossa toteutettiin vuosina 2000–2003 TE-keskuksen rahoittamana HAKA-Jalostuseläinten tuotantorenkaat -hanke, jonka toimesta perustettiin 12 alkiontuotantorengasta kattaen 113 alkiontuotantotilaa ja 121 alkioiden vastaanottajatilaa. Vuoden 2003 loppuun mennessä oli tuotettu lähes 1400 siirtokelpoista alkioita alkioiden luovuttajaeläimistä, joiden tuotostaso ja jalostusarvo ylittivät reilusti valtakunnallisen sonninemätason. HAKA -hankkeessa myös toteutettiin kokeiluluonteisesti alkioiden sukupuolilajittelua tilaoloissa (Viitanen 2007). HAKA -hanke jatkoi työtään vuosina 2004 - 2005 HAKA-Huippueläimet Pohjois-Savosta -nimellä tehden Pohjois-Savon eläinaineksesta sekä kansallisesti että kansainvälisesti tunnetun (Haka-brändi). HAKA-Huippueläimet Pohjois-Savosta -hanke myös takasi jatkumon alkiontuotantorengastoiminnalle Pohjois-Savossa (HAKA -alkiot, <http://www.haka-alkiot.fi/>) ja se tuki pilotointia alkioiden sukupuolilajittelun kehittämiseksi.

Vuosina 2005–2006 Pohjois-Savon Liiton rahoittama AATE -hanke ”Alkioanalytiikalla tehoa Pohjois-Savon lypsykarjojen jalostukseen” jatkoi alkionsiirtopalvelujen saatavuuden lisäämistä, kustannusten alentamista sekä huippuosaamiseen perustuvien uusien alkionsiirtopalvelujen synnyttämistä Pohjois-Savossa. Hanke kurssitti alkionsiirtoseminologeja tilatason alkioityön osaajiksi. Hankkeessa kehitettiin säilytysmenetelmiä alkioanalyysin läpikäyneille alkioille. Sukupuolilajitelluille alkioille kehitettiin tuoresäilytysmenetelmä, joka mahdollisti alkioiden kuljetuksen analysipaikalta alkionsiirto-paikalle säilytyksen kuluessa. Tilatasolle soveltuvan markkeriavusteisen alkiovalinnan kehittämiseksi testattiin analysoitujen alkioiden kylmäsäilytyksen jälkeistä tiineytävyyttä. (Kananen-Anttila 2005).

2.3. OPU-IVP -hankkeen toteuttamismahdollisuudet Pohjois-Savossa

Pohjoissavolaisten maitotilayritysten korkeatasoinen ammattitaito ja eläinainees sekä aktiivisuus alkionsiirtotekniikoiden hyödyntämisessä käytännön eläinjalostuksessa luovat ihanteellisen toimintaympäristön alkionsiirtoteknologioiden kehittämiseksi tilatasolla. Pohjois-Savon alueella toimivalla FABAn eli Finnish Animal Breeding Associationin jalostuspäällikkö Anita Hyvösellä on erinomaiset yhteydet alueen maitotilayrityksiin, jotka jo harjoittavat alkionsiirtojalostusta karjoissaan. Anita Hyvönen pystyy valitsemaan Pohjois-Savosta sopivat tilat, jotka voisivat osallistua hankkeeseen. HAKA-Jalostuseläinten tuotantorenkaat -hankkeessa ja HAKA - Huippueläimet Pohjois-Savosta -hankkeessa vetäjänä toiminut Anita Hyvönen tuntee tilat hyvin ja on ollut luomassa HAKA -brändin. Hänellä on vankka kokemus tilojen kouluttamisesta uusiin lisääntymistekniikoihin.

Viking Genetics on yhteispohjoismainen jalostusorganisaatio, jonka tähtäimessä on lypsykarjan jalostuksen parantaminen Suomessa. Hollolassa sijaitsevan aseman eläinlääkärit alkionsiirtoeläinlääkäri ELL Marja Mikkola ja asemaeläinlääkäri ELL Henri Simonen saavat kokemusta hiehojen OPUuttamisesta keväällä 2015 alkavan OPUtushjelman puitteissa. Heidän kauttaan saadaan tukea ja taustatietoa tilaOPU -hankkeelle.

Savonia-ammattikorkeakoulu on yksi Suomen suurimmista ja monipuolisimmista ammattikorkeakouluista, jossa opiskelee lähes 6000 opiskelijaa. Savonian Iisalmen toimipaikan kotieläintuotannon lehtori MMM Hilka Kämäräinen ja yliopettaja MMM, PhD Heli Wahlroos ohjaavat projektiopintoina OPUun liittyvää aihetta, jossa tarkastellaan karjanomistajan saamaa hyötyä OPU-tekniikasta, eläimen valintaa OPUun sekä miten maitotilayrittäjä motivoidaan oputtamaan suunnitelmallisesti huomioiden jalostukselliset näkökulmat niin, että OPU-tekniikka saadaan vakiintumaan Pohjois-Savon eläinjalostukseen. Edellä mainittujen projektiopintojen kirjallinen raportti yhdessä tämän kirjoituksen kanssa hyödyttävät OPU-IVP -hankkeen eteenpäin viemistä.

Itä-Suomen yliopistossa (aiemmin Kuopion yliopisto, soveltavan biotekniikan instituutti (SBI), myöhemmin biotieteiden laitos) toimi vuoteen 2007 saakka nelihenkinen naudan alkioiden tuotanto-, keräys- ja siirtoryhmä, jonka alkionsiirtoeläinlääkärinä toimi erikoistutkija ELT Heli Lindeberg ja jonka tehtävänä oli alkionsiirtotekniikoita hyödyttävä tutkimus, asiakasalkiotuotanto sekä lisääntymisfysiologian ja keinollisten lisääntymistekniikoiden opetus. Kaupallinen asiakasalkiotuotanto toteutettiin maksullisena palvelutoimintana: SBI:n alkiontuotantoryhmä tuotti FABA:n edeltäjälle Jalostuspalvelulle (JAPA) koeputkialkioita jalostuksellisesti arvokkaiden teuraseläinten munasoluista ja tilauksesta asiakkaille vientivaatimukset täyttäviä huuhtelualkioita. Ryhmän alkionhuuhteluihin suoraanaisesti liittyvä tutkimus keskittyi sukupuolilajiteltujen alkioiden tuore- ja kylmäsäilytykseen AATE -hankkeessa (Julkunen 2009), jonka vetovastuu alkiontuotantoryhmän alkiotutkija FT Kirsi Kanasella oli ja jonka alkionhuuhtelut teki ELT Heli Lindeberg vuosina 2005–2006.

Itä-Suomen yliopiston syntymisen jälkeen biotieteiden laitos Kuopion kampuksella lakkautettiin ja alkionlaboratorion toiminta päättyi. Tämän vuoksi Pohjois-Savon alueella ei ole tällä hetkellä naudan alkiontuotantoon erikoistunutta laboratoriota. Lähin ja tällä hetkellä Suomen ainoa naudan koeputkialkioita tuottava laboratorio sijaitsee erikoistutkija FT Jaana Peipon vetämänä Jokioissa Luon-

nonvarakeskuksessa (ent. MTT). Laboratoriossa on tuotettu OPU-koeputkialkioita aiemmissa hankkeissa vuosina 2002, 2005 ja 2012–2014 sekä ASMO-jalostusohjelmassa vuosina 1999–2000 ja alkioista on syntynyt eläviä vasikoita. Luke Jokioinen aloittaa keväällä 2015 yhteispohjoismaisen jalostusorganisaatio Viking Geneticsin kanssa yhteistyöhankkeen, jossa Viking Geneticsin Hollolan asemalle sijoitetuista hiehoista kerätään munasoluja, joista tuotetaan alkioit Luke Jokioisten alkiolaboratoriossa. Viking Geneticsin Hollolan asemalla OPU-IVP on tarkoitus kehittää rutiinitavaksi tuottaa naudan koeputkialkioita kaupalliseen käyttöön. Samalla testataan munasolujen lähettäminen Hollolasta Jokioisiin. On hyvin todennäköistä, että hankkeessa saatuja tuloksia voidaan soveltaa myöhemmin Pohjois-Savon tilatason OPU-IVP -hankkeessa.

Hiehoja ja lehmiä ovat Suomessa OPUTTaneet Luke Jokioisilla ASMO-jalostusohjelmassa ja muissa OPU-koeputkialkioita tuottaneissa hankkeissa mukana olleet eläinlääkärit (7 kpl). OPUtustekniikan hallussapysyminen vaatii jatkuvaa harjoitusta onnistuakseen toistuvasti. Pohjois-Savon alueella ovat yli 15 vuoden ajan toimineet alkionsiirtoeläinlääkärit Kirsi Vartia ja Iris Kaimio. He huuhtelevat vuosittain noin 100 nautaa Pohjois-Savon alueella. He ovat molemmat myös OPUTTaneet aiemmin ollessaan töissä Luke Jokioisilla. Luke Maaningan aseman Halolan tutkimuspihatto (CowLab™) soveltuu erinomaisesti paikaksi, jossa alkionsiirtoeläinlääkärit ELL Kirsi Vartia ja ELL Iris Kaimio sekä ELT Heli Lindeberg voivat harjoitella OPUTTamista ja hioa tekniikan tilakäyttöön sopivaksi ennen OPU-IVP -hankkeen tilaOPU -osioon siirtymistä. Halolan tutkimuspihaton tutkimusmestarit ja muu henkilökunta ovat tottuneita erilaisten ruokinta- ja lisääntymiskokeiden järjestelyihin. Navetassa voidaan järjestää kohtuullisilla muutostöillä tila, jossa munasolujen keräys onnistuu. Navetan läheisyydessä sijaitsevassa erillisessä tutkimustilassa kumulussolu-munasolukompleksit voidaan etsiä OPUtusteestä ja valmistella lähetystä varten Luke Jokioisten alkiolaboratorioon. Menetelmät voidaan testata käytövalmiiksi ennen tilaOPU -osioon siirtymistä.

2.4. OPU-IVP -hankkeen kuvaus

2.4.1. Hankkeen I-osio = OPU-IVP Maaningan tutkimusnavetassa (CowLab™)

- OPUtuslaitteiston hankinta ja pystytys
- OPUtuspaikan mahdolliset muutostyöt Maaningan tutkimusnavetassa
- tekniikan harjoittelu Maaningan tutkimusnavetassa 10–12 lehmällä
- luovuttajaeläinten hormonikäsittelyn testaus (yhden FSH-hormonipistoksen ohjelma, Chasombat ym. 2013)
- kaksi OPUtusta eläintä kohden 3–4 päivän välein
- verinäytteiden keräys OPUtettavista eläimistä ennen hormonikäsittelyä
- anti-Müllerian hormonipitoisuuden määrittäminen verinäytteistä
- munasolujen etsintä Maaningalla ja lähettäminen Jokioisiin
- munasolujen lähettämisen testaaminen Jokioisten alkiolaboratorioon
- alkiolaboratoriossa munasolujen ja niistä tuotettujen alkioiden kypsytyksen, hedelmöityksen ja kasvatusolosuhteiden optimointi
- alkiolaboratoriossa OPU-IVP -alkioiden tuottaminen
- tuotettujen OPU-IVP -alkioiden tuorekuljetuksen testaaminen
- tuotettujen OPU-IVP -alkioiden pakastus
- tuore- ja pakasteOPU-IVP -alkioiden siirtäminen Halolan vastaanottajiin
- tuore- ja pakasteOPU-IVP -alkioiden tiineys- ja vasikkaprosentit
- kesto noin 18 kk

2.4.2. Hankkeen II-osio = tilaOPU-IVP Pohjois-Savon lypsykarjatilalla

- mukana valitut tilat, joiden toiseksi parhaat hiehot, 20 eläintä
- tilallisten kouluttaminen
- valituilla tiloilla OPUtuspaijan järjestäminen
- kaksi OPUtusta eläintä kohden 3–4 päivän välein
- munasolujen etsintä tilalla ja lähettäminen Jokioisiin alkiolaboratorioon
- alkiolaboratoriossa koepuotkiotuoanto ja tuotettujen OPU-IVP -alkioiden tuorekuljetus
- tuorekuljetettujen OPU-IVP -alkioiden siirtäminen valituilla tiloilla
- tuorekuljetettujen OPU-IVP -alkioiden tiineys- ja vasikkaprosentit
- kesto noin 18 kk

3. Lähteet

- AETE 2004. Proceedings of the 20th Annual Meeting of A.E.T.E., Lyon, Ranska, 10.-11.9.2004.
- AETE 2013. Proceedings of the 29th Annual Meeting of A.E.T.E., Istanbul, Turkki, 6.-7.9.2013.
- Betteridge, K. & Rieger, D. 1993. Embryo transfer and related techniques in domestic animals, and their implications for human medicine. *Human Reproduction* 8: 147–167.
- Bols, P.E., Vandenheede, J.M., Van Soom, A. & De Kruif, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677–687.
- Bols, P.E., Ysebaert, M.T., Van Soom, A. & De Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221–1236.
- Boni, R., Roviello, S. & Zicarelli, L. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899–909.
- Bordignon, V., Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D. & Smith, L.C. 1997. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology* 48: 291–298.
- Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G. & Durocher, J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51: 59–70.
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. & Dressel, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27:147–158.
- Brogliatti, G.M. & Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology* 45: 1163–1176.
- Brogliatti, G.M., Palasz, A.T. & Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration and oocyte collection in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 45: 249 (tiivistelmä).
- Brück, I. & Greve, T. 1994. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 41: 170 (tiivistelmä).
- Callesen, H., Greve, T. & Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27: 217 (tiivistelmä).
- Cebrián Serrano, A. 2013. Factors affecting the *in vitro* embryo production in cattle associated to ovum pick up system. Väitöskirja. Polytechnic University of Valencia, Espanja. 156 s.
- Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R. & Vongpralub, T. 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 44: 488–500.
- Chastant-Maillard, S., Quinton, H., Lauffenburger, J., Cordonnier-Lefort, N., Richard, C., Marchal, J., Mormede, P. & Renard, J.P. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 125: 555–563.
- Chaubal, S.A., Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Ferre, L.B., Faber, D.C., Bols, P.E., Riesen, J.W., Tian, X. & Yang, X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631–1648.
- Cunningham, E.P. 1998. The potential of new reproductive and genetic technologies. *Acta Agriculturae Scandinavica Supplement* 29: 67–76.
- Dai, S.-J., Xu, C.-L., Wang, J., Sun, Y.-P. & Chian, R.-C. 2012. Effect of culture medium volume and embryo density on mouse embryonic development: tracking the development of the individual embryo. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29: 617–623.
- Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C., Gerlinger, P., Brun, B. & Rumpler, Y. 1984. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 1: 1467.
- Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C. & Gerlinger, P. 1985. Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fertility and Sterility* 44: 656–662.
- De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P. & Dessy, F. 2005. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science* 86: 13–25.
- De Roover, R., Feugang, J.M., Bols, P.E., Genicot, G. & Hanzen, C. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 239–245.

- Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires, T.J. & Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977–987.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G. & Lazzari, G. 1998. Embryo production by ovum pick up in water buffalo. *Theriogenology* 49: 400 (tiivistelmä).
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R. & Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341–1357.
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I. & Lazzari, G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 98: 39–55.
- Galli, C., Lagutina, I., Duchi, R., Colleoni, S. & Lazzari, G. 2008. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reproduction in Domestic Animals (Supplement 2)* 43: 331–337.
- Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I. & Lazzari, G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81: 138–151.
- Gandolfi, F. & Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 23–28.
- Gasparrini, B. 2002. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57: 237–256.
- Gleicher, N., Friberg, J., Fullan, N., Giglia, R.V., Mayden, K., Kesky, T. & Siegel, I. 1983. Egg retrieval for in vitro fertilization by sonographically controlled vaginal culdocentesis. *Lancet* 2: 508–509.
- Graff, K.J., Meintjes, M., Paul, J.B., Dyer, V.W., Denniston, R.S., Ziomek, C. & Godke, R.A. 1995. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. *Theriogenology* 43: 223 (tiivistelmä).
- Hagemann, L.J., Beaumont, S.E., Berg, M., Donnison, M.J., Ledgrad, A., Peterson, A.J., Schurmann, A. & Tervit, H.R. 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction and Development* 53: 451–458.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. & Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141–152.
- Hwang, W.S., Lee, K.N. & Lee, B.C. 1997. Effect of bST co-treatment with FSH or PMSG on transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in calves. *Theriogenology* 47: 159 (tiivistelmä).
- Julkunen, H. 2009. AATE-hanke: Alkioanalytiikalla tehoa Pohjois-Savon lypsykarjojen jalostukseen. Tulokset vuosilta 2005-2007. Luonnontieteiden kandidaatti –tutkielma. Kuopion yliopisto, Kuopio, Suomi. 39 s.
- Kananen-Anttila, K. 2005. Alkioanalytiikalla tehoa Pohjois-Savon lypsykarjojen jalostukseen (AATE). Hankesuunnitelma, Kuopion yliopisto, Kuopio, Suomi. 13 s.
- Kendrick, K.W., Bailey, T.L., Grast, A.S., Pryor, A.W., Ahmadzadeh, A., Akers, R.M., Eyestone, W.E., Pearson, R.E. & Gwazdauskas, F.C. 1999. Effects of energy balance of hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *Journal of Dairy Science* 82: 1731–1741.
- Konishi, M., Aoyagi, Y., Takedomi, T., Itakura, H., Itoh, T., Yazawa, S., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G. & Kanagawa H. 1996. Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology* 46: 33–43.
- Kruip, T.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M & Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675–684.
- Lacaze, S., Marquant-Le Guienne, B., Delalleau, N., Richet, L., Matmar, S., Nibart, M. & Humblot, P. 1997. Centralized in vitro embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection: effects of parity and superovulation treatment. *Theriogenology* 47: 161 (tiivistelmä).
- Leroy, J.L., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I.G. & Bols, P.E. 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 612–622.
- Leroy, J., Van Soom, A., Opsomer, G., Goovaerts, I. & Bols, P. 2008b. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition

- and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 623–632.
- Leroy, J.L.M.R., Rizos, D., Sturmey, R., Bossaert, P., Gutierrez-Adan, A. & Van Hoeck, V., Valcks, S. & Bols, P. E.J. 2012. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 1–12.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. & Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 37: 48–53.
- Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. & Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41: 67–72.
- Lu, K., Gordon, I., Gallagher, M. & McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Veterinary Record* 121: 259–260.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E. & Tomanek, M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61: 329–335.
- Mapletoft, R.J., Steward, K.B. & Adams, G.P. 2002. Recent advances in superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42: 601–611. <10.1051/md:2002046>.<hal-00900425>.
- Merton, J.S., De Roos, A.P., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L. & Dieleman, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651–674.
- Merton, J.S., Ask, B., Onkundi, D.C., Mullaart, E., Colenbrander, B. & Nielen, M. 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-in vitro production embryo-production program. *Theriogenology* 72: 885–893.
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y. & Larroque, H. 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reproduction, Fertility and Development* 22: 1083–1091.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H. & First, N.L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozenthawed semen. *Theriogenology* 25: 591–600.
- Petyim, S. 2002. Ovum pick-up in dairy heifers. Effects on ovary, ovarian function and animal well-being. Väitöskirja. Swedish University of Agricultural Sciences, Veterinaria 141, Uppsala, Sweden. 116 s.
- Petyim, S., Båge, R., Madej, A. & Larsson, B. 2007. Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect animal well-being? *Reproduction in Domestic Animals* 42: 623–632.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.A.M. & Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751–762.
- Reichenbach, H-D., Wiebke, N.H., Wenigerkind, H., Mödl, J. & Brem, G. 1994. Bovine follicular oocytes collected by laparoscopic guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 41: 283 (tiivistelmä).
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J-L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S. & Monniaux, D. 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 932–944.
- Schellander, K., Fayrer-Hosken, R.A., Keefer, C.L., Brown, L.M., Malter, H., McBride, C.E. & Brackett, B.G. 1989. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 31: 927–934.
- Sirard, M.A., Picard, L., Dery, M., Coenen, K. & Blondin, P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51: 699–708.
- Staigmiller, R.B. & Moor, R.M. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research* 9: 221–229.
- Stephoe, P.C. & Edwards, R.G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366.
- Tervit, H.R., Whittingham, D.G. & Rowson, L.E. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493–497.
- Van de Leemput, E.E., Vos, P.L., Zeinstra, E.C., Bevers, M.M., van der Weijden, G.C. & Dieleman, S.J. 1999. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 52: 335–349.

- Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65: 914–925.
- Viitanen, E. 2007. HAKA – Huippueläimet Pohjois-Savosta -alkionsiirtohankkeen tulokset vuosilta 2000-2006. Luonnontieteiden kandidaatti -tutkielma. Kuopion yliopisto, Kuopio, Suomi. 38 s.
- Vos, P.L., de Loos, F.A., Pieterse, M.C., Bevers, M.M., Taverne, M.A. & Dieleman, S.J. 1994. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology* 41: 829–840.



Luonnonvarakeskus
Viikinkaari 4
00790 Helsinki
puh. 029 532 6000